

# エールリツヒ腹水癌細胞による Triphenyltetrazolium Chloride存在下でのジカル ボン酸の酸化に関する研究

著者	佐藤 清美
号	275
発行年	1965
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/18140">http://hdl.handle.net/10097/18140</a>

氏 名 佐 藤 清 美

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 0 年 3 月 5 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項

最 終 学 歴 昭 和 3 4 年 3 月 東 北 大 学 医 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 エールリツヒ腹水癌細胞による Triphen-  
yltetrazolium Chloride 存在下で  
のジカルボン酸の酸化に関する研究

論文審査委員 東北大学教授 立 木 蔚

東北大学教授 菊 地 吾 郎

東北大学教授 吉 沢 善 作

## 論 文 内 容 要 旨

われわれはさきにエールリツヒ腹水癌細胞( EC )を用いて, Triphenyltetrazolium Chloride( TTC)が(a)コハク酸酸化酵素系に影響をおよぼさないで,  $\text{NADH}_2$  酸化酵素系を強く阻害する( アミタール様作用 ), (b)五炭糖リン酸回路で発生する  $\text{NADPH}_2$  の酸化を強く促進する( メチレン青( MD )様作用 )などの作用をもつことをあきらかにした。本研究は, EC の有機酸代謝系に対する TTC の作用を追求したもので, 特に TTC の存在下では TCA サイクルの回転が強く抑制されていると考えられるにもかかわらず, コハク酸-1, 4- $\text{C}^{14}$  からの  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成が殆ど抑制されず, かえつて軽度促進され, またフマル酸-1, 4- $\text{C}^{14}$  からの  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成は著明に促進されることを観察したので, この促進作用があらわれる機構を解明し, 同時にこの解明を通じて TTC の特異作用や EC の有機酸代謝系について新知見を得ようと意図したものである。また EC において従来グルコースがコハク酸-1, 4- $\text{C}^{14}$  からの  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成を強く促進することが知られていたため, TTC の特異作用を利用して, この促進作用の機構を明らかにしようと企てた。

## 材 料 と 方 法

dd系マウスに移植した EC を pH 7.4 の Krebs-Ringer リン酸緩衝液に浮遊させ,  $\text{C}^{14}$  でラベルしたコハク酸やフマル酸などとワールブルグフラスコ中で TTC (その他の添加物) の添加あるいは無添加の条件で  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させた。酸素消費量はワールブルグ検圧計を用いて測定,  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成量は  $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$  として infinite thickness 法で求めた。乳酸は Barker-Summerson, ビルビン酸は Lardy の方法で比色定量, またリンゴ酸, ビルビン酸, 乳酸などの有機酸への  $\text{C}^{14}$  のとりこみ量も測定した。この際各有機酸の単離は立木・菊地の方法に準じ, ペーパークロマト法で行った。

## 結 果 と 考 按

1) ビルビン酸-2- $\text{C}^{14}$ , フマル酸-2, 3- $\text{C}^{14}$  からの  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成は TTC の濃度増加とともに著明に低下し, 3.0 mM ではほとんど消失, またこの際酸素消費も強く阻害されたにもかかわらず, 同じ 3.0 mM でコハク酸-1, 4- $\text{C}^{14}$  からの  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成は軽度促進され, フマル酸-1, 4- $\text{C}^{14}$  では, 無添加系の 5~6 倍に達する  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  の生成をみた。この  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  生成と平行してビルビン酸+乳酸の生成( 定量によつても, コハク酸-1, 4- $\text{C}^{14}$  からの  $\text{C}^{14}$  のとりこみによつても )が認められ, これらの実験結果から, TTC は高濃度で TCA サイクルの回転を強く阻害するにもかかわらず, ジカルボン酸のビルビン酸への脱炭酸を強く促進していることがあきらかとなつた。

2) TTC と同様五炭糖リン酸回路の  $\text{NADPH}_2$  の酸化を促進することが知られている MB やメナジオンは単独添加では促進効果がなく, アミタールの同時添加を必要とした。またビルビン

酸とアミタールの同時添加系でも同様な促進効果がみられた。一方 T T C の促進効果にはアミタールの有無は殆ど影響を示さなかつた。T T C やアミタールの添加系では無添加系に比べて、コハク酸-1, 4- $C^{14}$  からのリンゴ酸への  $C^{14}$  のとりこみが著明であつた。これらの実験事実から、T T C の促進効果は  $NADPH_2$  再酸化の促進 (M B 様作用) によるものであること、しかしこの効果があらわれるためには同時に  $NADH_2$  酸化酵素系の阻害 (アミタール様作用) が必須の条件であることがあきらかとなつた。

3) 以上の実験結果を綜合して、T T C が促進するジカルボン酸のピルビン酸への脱炭酸反応は、"malic enzyme" に触媒されるリンゴ酸のピルビン酸への酸化的脱炭酸反応であり、T T C はそのアミタール様作用によつてリンゴ酸のレベルを上げ、M B 様作用によつて発生した  $NADPH_2$  の酸化を促進することによつて、定常的にこの脱炭酸反応を促進するものと推定した。

4) 一方、コハク酸-1, 4- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  生成に対するグルコースの促進効果が解糖の進行にともなう反応液の pH の低下にもとづくという Wenner の指摘を再確認したが、さらにこの促進効果が T T C 3.0 mM あるいはアミタール 2.0 mM の添加によつて完全に消失することを見出した。この条件では T T C の促進効果も観察されなかつた。しかし強緩衝力のある緩衝液を用いて解糖による pH の低下を防止すると、グルコースの促進効果はあらわれないが、T T C のそれは認められた。これらの実験事実から、E C には少くともふたつのジカルボン酸の脱炭酸反応が存在することが推定される。ひとつは "malic enzyme" によるリンゴ酸のピルビン酸への脱炭酸である。この反応に対する T T C の促進効果が低 pH 値で出現しないのは、おそらく低 pH 値でのこの酵素活性の低下によるものであろう。もうひとつはグルコース添加により促進される反応経路で、その本態は不明であるが、アミタール (あるいは T T C) によつて阻害され pH の低下によつて促進されるので、オキサロ酢酸が直接の基質となつている脱炭酸反応であろうと推定した。この反応の存在はアミタールで抑制されたフマル酸-1, 4- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  生成がオキサロ酢酸の同時添加でピルビン酸の添加よりもはるかに強く促進された事実からも考えられた。

## 結 論

1) Triphenyltetrazolium chloride (T T C) の存在下ではエールリツと腹水癌細胞の T C A サイクルの回転は強く抑制されているにもかかわらず、コハク酸-1, 4- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  生成は殆ど影響されず、フマル酸-1, 4- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  の生成は著明に促進された。

2) この場合の代謝経路を究明した結果、T T C は  $NADP$  依存の "malic enzyme" によるリンゴ酸からピルビン酸への酸化的脱炭酸反応を促進すると解される。

3) 解糖に伴う反応液の pH の低下時には T T C の添加はかえつてコハク酸-1, 4- $C^{14}$  およびフマル酸-1, 4- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  生成を抑制した。よつてこの条件下における上記基質代謝経路につき考察を加え、この場合の脱炭酸の直接の基質はオキサロ酢酸であろうことを推定した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

著者が研究の対象とした *Triphenyltetrazolium chloride* (TTC) は、従来著者らによつて、Ehrlich 腹水ガン細胞でのグリコース代謝に対するその特異な作用が注目されていた物質である。本研究は、コハク酸・フマル酸を基質とした場合の Ehrlich ガン細胞の有機酸代謝系に TTC がどのような作用を示すかを追求したもので、この追求を通じて特に、代謝研究一般に利用し得る TTC の特異な性状を確立するとともに、ガン細胞の有機酸代謝に関する新知見をも得ようと企てた。

著者は先づ、TTC 3 mM の添加によつてジカルボン酸-2- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  生成がほとんど完全に消失するにもかかわらず、1- $C^{14}$  からの  $C^{14}O_2$  生成はかえつて促進されるという観察に出発し、この TTC の効果を、作用既知のメチレンブルー・メナジオン・アミタールなどの水素受容体や代謝阻害剤の単独あるいは組合せの効果と比較検討して、TTC の 1- $C^{14}O_2$  生成に対する促進効果は malic enzyme によるリンゴ酸のピルビン酸への酸化的脱炭酸の促進によるものであり、この促進効果は TTC の  $NADPH_2$  再酸化の促進作用によつてあらわれるが、その際、TTC の第二の作用である  $NADH_2$  酸化酵素系の阻害も必須の条件であることをあきらかにした。

以上の成績は、TTC の作用機序とその代謝研究上の有用性を確立した点できわめて有意義な成績であるが、同時に、ガン細胞の生理的なジカルボン酸代謝を考えるに当つても多大の示唆を与えるもので、この点でも著者の成績はきわめて有意義なものと考えらる。

したがつて、本論文は学位授与に値するものと判定する。